

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18944

研究課題名(和文)腎臓がんの転移・浸潤予防に向けてのガレクチン-1の機能解明

研究課題名(英文)Role of galectin-1 as a target of suppression and prevention for metastasis of renal cell carcinoma

研究代表者

山森 元博(Yamamori, Motohiro)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：10444613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓がんの転移におけるgalectin-1の役割を明らかにすることを目的とした基礎的研究を実施した。ACHN細胞において、galectin-1の刺激により細胞の遊走能が増大することを確認し、そのメカニズムにはgalectin-1の細胞骨格の制御への関与が示唆された。一方、内因性galectin-1は腎臓がん細胞の遊走および浸潤には関与しないことが明らかになった。本研究の結果からGalectin-1が腎臓がんの転移抑制および予防のターゲット分子となり得ることが示された。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to investigate the impact of galectin-1 in metastasis of renal cell carcinoma (RCC). Human RCC-derived ACHN cell line showed a significant increased migration after treatment with galectin-1, which may be mediated by regulation of the cytoskeletal dynamics. Meanwhile, we observed no effect of endogenous galectin-1 on RCC cell lines migration and invasion. This study suggests that galectin-1 can be considered as a target of suppression and prevention for metastasis of RCC.

研究分野：臨床薬学

キーワード：臨床薬学 galectin-1 腎臓がん

1. 研究開始当初の背景

腎臓がんは、転移をしやすいことが知られており、10~20年に渡って転移・再発の恐れがある。既存の腎臓がん治療薬では、がん転移の抑制・予防効果は期待できないため、転移の抑制・予防を目的とした新たな治療ターゲットの探索が急務の課題である。

Galactinは、ガラクトース結合型レクチンファミリーに属し、ヒトでは10種類以上が同定されている。本研究の対象であるgalectin-1 (Gal-1)は、乳がんや胃がんなどの多くの腫瘍で発現が確認されており、予後に関連することが報告されている。一方、腎臓がんにおいては、これまでに研究代表者らが、患者の腫瘍組織中にGal-1が高発現していることを報告した。また、その後、他研究施設から腎臓がん転移患者では、非転移患者に比べて、血漿中のGal-1濃度が高値を示すことが報告され、腎臓がんの転移にGal-1が関与している可能性が示されている。しかしながら、腎臓がんの転移におけるGal-1の役割については、不明な点が多く、詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、腎臓がんの転移抑制・予防を目指した新規治療ターゲット分子の探索を目的とした。そのために、腎臓がんの転移におけるGal-1の役割とそのメカニズムを解明するための基礎的検討を行った。

3. 研究の方法

Gal-1には外因性と内因性のものが知られており、それぞれのヒト腎臓がん由来細胞に与える影響を確認した。すなわち、以下の方法を用いて、高濃度Gal-1処置条件下および細胞内Gal-1抑制下における腎臓がん細胞の増殖、遊走および浸潤への影響について検討した。

a. 細胞培養

ヒト腎臓がん由来細胞であるACHN、786-OおよびCaki-2細胞は、それぞれ10%非働化ウシ胎児血清(FBS)およびペニシリン・ストレプトマイシン溶液含有D-MEM、RPMI 1640およびMcCoy's 5Aを用いて5%CO₂インキュベーター内(37°C)において培養した。

b. 細胞増殖実験

外因性Gal-1に関する検討では、各細胞を96-well培養プレートに播種後24時間培養し、ヒト組換え体galectin-1で72時間処置した。内因性Gal-1に関する検討では、siRNA導入細胞を96-well培養プレートに播種し、FBS不含培地で24、48および72時間培養した。いずれの検討でもCell Quanti-Blue™試薬を添加し、37°Cで2時間インキュベート後に蛍光強度を測定し、生存率を算出した。

c. 遊走および浸潤試験

浸潤はBioCoat™ Matrigel Invasion Chamber、遊走はmatrigel非コーティングchamberを用いて検討した。各細胞を播種後、ヒト組換え体galectin-1を24時間処置した。細胞を10%FBSで下層に誘引し、下層に移動した細胞を染色後、顕微鏡を用いて細胞数を計測した。

d. siRNAの導入

各細胞を抗生剤を含有しない10%FBS含有培地で24時間培養した後、Silencer Select Negative control siRNAおよびSilencer Select Validated siRNAを導入した。

e. mRNA発現解析

各細胞をsiRNAで24時間処置後、RNAの抽出、逆転写およびリアルタイムPCRを行った。各目的遺伝子に対するTaqMan® Gene Expression Assaysを用いて、StepOne™ Real Time PCR (Thermo Fisher Scientific)でmRNAを検出した。

f. Western blot法によるタンパク質発現解析

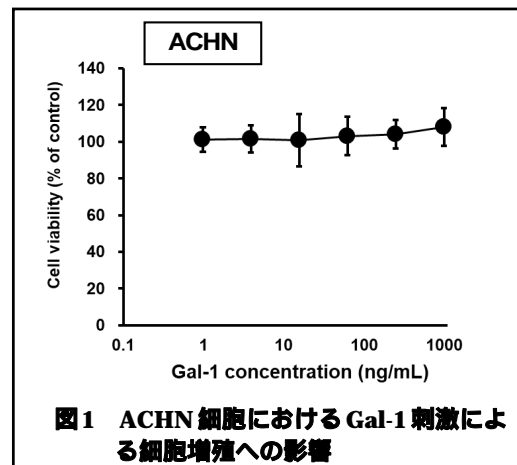
各細胞を播種し、各種試薬の処置後に回収した細胞から蛋白を回収した。一次抗体として、マウス抗 β -actin抗体およびウサギ抗galectin-1抗体を反応させ、二次抗体には、HRP標識ヒツジ抗マウスIgG抗体およびヤギ抗ウサギIgG抗体を用いた。

4. 研究成果

A. 高濃度Gal-1処置条件下における腎臓がん細胞の増殖、遊走および浸潤への影響についての検討

(増殖への影響)

各細胞をヒト組換え体galectin-1共存下で72時間培養後、生存細胞数を計測したところ、いずれの細胞においてもコントロール細胞に比べて顕著な増加は認められなかった。図1にはACHN細胞による結果を示した。したがって、外因性Gal-1による刺激は、細胞増殖や生存には影響を及ぼさないことが示唆された。



(遊走・浸潤への影響)

各細胞を用いて、ヒト組換え体 galectin-1 共存下での遊走および浸潤への影響を検討したところ、ACHN 細胞を galectin-1 500 および 1000 ng/mL で処置したときに、遊走細胞数が有意に増加した。一方、浸潤細胞数には影響を及ぼさなかった (図 2)。

なお、786-O 細胞および Caki-2 細胞においては、遊走および浸潤細胞数に顕著な変動は認められなかった。したがって、細胞によって反応性の違いはあるものの、外因性 Gal-1 による刺激は、細胞の遊走に影響を及ぼす可能性が考えられた。

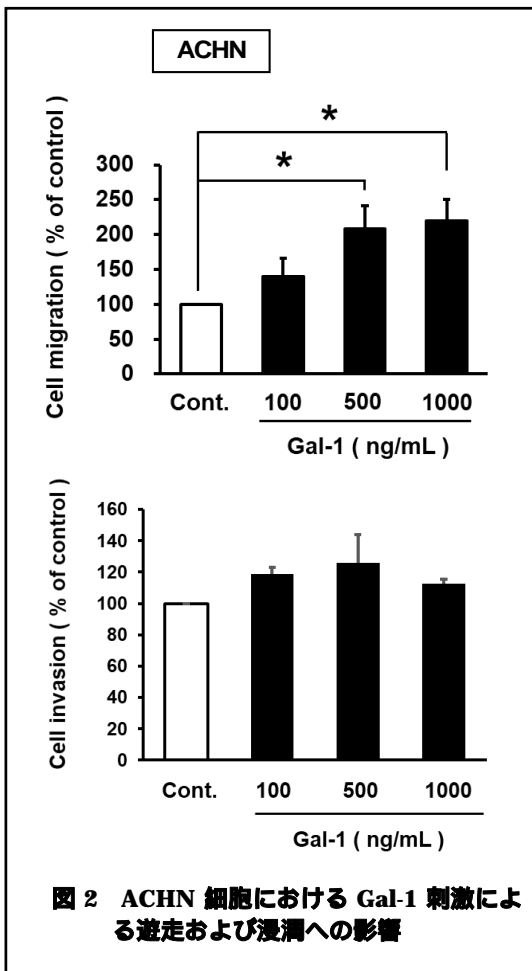


図 2 ACHN 細胞における Gal-1 刺激による遊走および浸潤への影響

B. 細胞内 Gal-1 抑制下における腎臓がん細胞の増殖、遊走および浸潤への影響についての検討

(siRNA 処置による Gal-1 ノックダウン細胞の作成)

各細胞に Gal-1 siRNA を導入した結果、Negative control siRNA を導入した細胞と比較して、Gal-1 siRNA を導入した細胞では、Gal-1 mRNA の発現が顕著に抑制された。図 3 には ACHN 細胞を siRNA 処置した結果を示した。

また、各細胞に Gal-1 siRNA を 72 時間処置した後、Western blot 法により細胞内

Gal-1 タンパク質を検出した結果、Gal-1 siRNA 処置により細胞内 Gal-1 タンパク質の発現が顕著に減少した (図 4)。

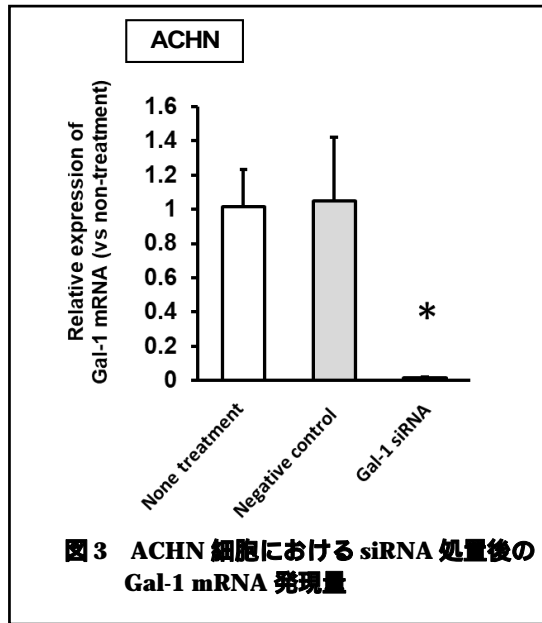


図 3 ACHN 細胞における siRNA 処置後の Gal-1 mRNA 発現量

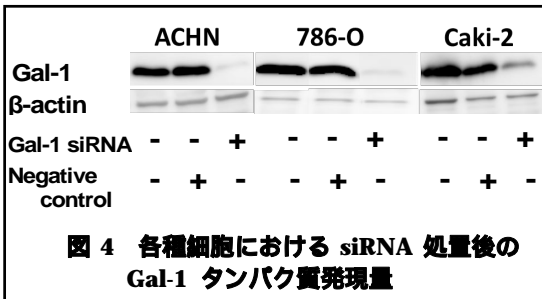


図 4 各種細胞における siRNA 処置後の Gal-1 タンパク質発現量

(増殖への影響)

Gal-1 ノックダウン後の細胞増殖への影響を確認した。各細胞ともに Gal-1 ノックダウンによる細胞増殖への影響は認められなかった。図 5 には ACHN 細胞を siRNA 処置した結果を示した。したがって、内因性 Gal-1 の発現は、細胞増殖や生存には影響を及ぼさないことが示唆された。

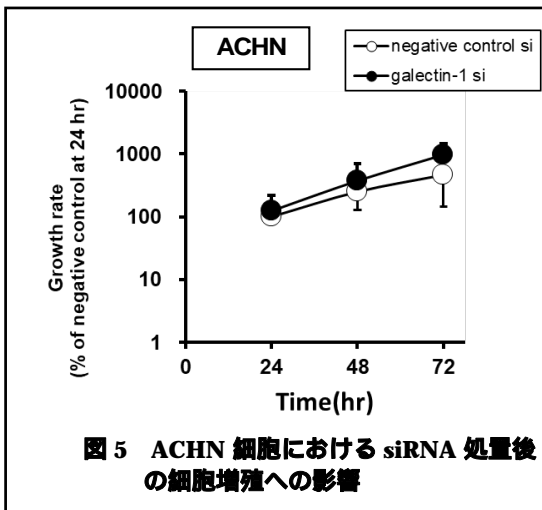


図 5 ACHN 細胞における siRNA 処置後の細胞増殖への影響

(遊走・浸潤への影響)

Gal-1 ノックダウン後の遊走および浸潤への影響を確認した。各細胞ともに Gal-1 ノックダウンによる遊走および浸潤への影響は認められなかった。図 6 には ACHN における結果を示した。また、Gal-1 ノックダウン後に、ヒト組換え体 galectin-1 50 および 500 ng/mL で処置したときの遊走および浸潤への影響を確認したが、有意な差は認められなかった。

したがって、内因性 Gal-1 の発現は、腎臓がん細胞の遊走および浸潤に関与しないことが示唆された。

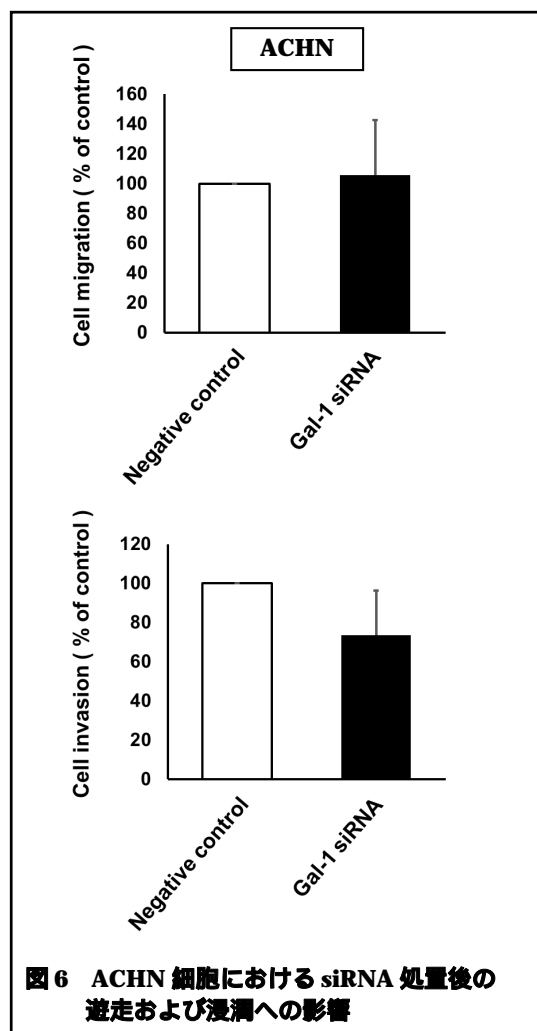


図 6 ACHN 細胞における siRNA 処置後の遊走および浸潤への影響

C. Gal-1 刺激による腎臓がん細胞の遊走促進に関する機序の解明

(細胞内タンパク質の発現変動の確認)

ACHN 細胞をヒト組換え体 galectin-1 で処置した際の細胞接着および細胞運動に関する細胞内タンパク質の発現変動を確認した。細胞接着分子である integrin の細胞内下流シグナルに寄与している FAK とそのリン酸化タンパク質に顕著な変動は見られなかった。一方、細胞運動に関与する RhoA は、Gal-1 刺激により増加傾向を示した。また、細胞シグナル伝達に重要な役割を果たす Akt のリン酸化タンパク質の増加が認められた

(図 7)。したがって、Gal-1 刺激による ACHN 細胞の遊走促進には、Akt/RhoA シグナル経路が関与している可能性が考えられた。

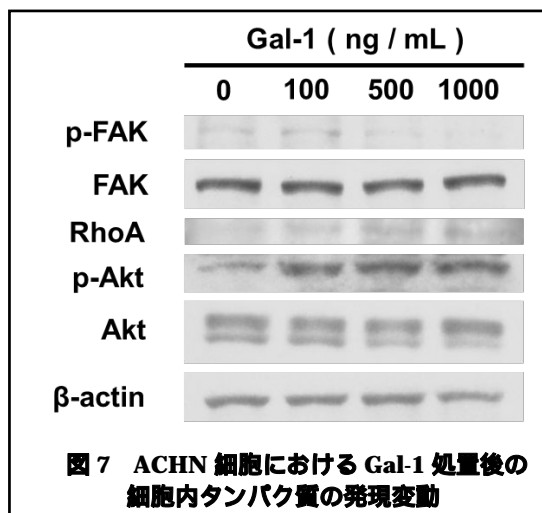


図 7 ACHN 細胞における Gal-1 処置後の細胞内タンパク質の発現変動

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Kurata K, Yakushijin K, Okamura A, Yamamori M, Ichikawa H, Sakai R, Mizutani Y, Kakiuchi S, Miyata Y, Kitao A, Kawamoto S, Matsuoka H, Murayama T, Minami H. Pharmacokinetics of intravenous mycophenolate mofetil in allogeneic hematopoietic stem celltransplanted Japanese patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 81:839-846, 2018. (査読有り)
2. Fujita M, Hasegawa A, Yamamori M, Okamura N. In vitro and in vivo cytotoxicity of troglitazone in pancreatic cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 36:1-9, 2017. (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

1. Kurata K, Okamura A, Yamamori M, Yakushijin K, Kawaguchi K, Higashime A, Ichikawa H, Sakai R, Mizutani Y, Kakiuchi S, Miyata Y, Kitao A, Kawamoto S, Matsuoka H, Minami H: Pharmacokinetics of intravenous mycophenolate mofetil after hematopoietic stem cell transplantation in Japanese population, *BMT Tandem Meetings*, February 21, 2018, United States
2. 山森元博、川上恵、長谷川愛、山口京子、前沙織、大石真子、岡村昇：腎臓がん細胞の遊走に及ぼす galectin-1 の影響、第 26 回日本医療薬学会年会、2016 年 9 月 17 日、国立京都国際会館(京都)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山森 元博 (YAMAMORI, Motohiro)

武庫川女子大学・薬学部・講師

研究者番号：10444613

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし